

Aus der Universitätsfrauenklinik Basel (Direktor: Prof. Dr. Th. Koller)
Arbeit unter der Leitung von P. D. Dr. R. Wenner, Basel

Versuche zur Ermittlung des Leberschwellenwertes für östrogene Stoffe bei Ratten und Meerschweinchen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

ANDRÉ LÉVY, von Peuchapatte, Kt. Bern



Verlag von S. Karger in Basel

Von der medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. *Th. Koller*.

Tag der Promotion: 22. November 1952.



Sonderdruck aus Gynæcologia, Vol. 136, No. 4, 1953.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Durch die Implantation von Ovarien oder deren hormoneller Produkte in die Milz kastrierter Tiere wurde es möglich, die Funktion der Leber im Hormonhaushalt des weiblichen Organismus genauer zu prüfen. Wenn es gelingt, die Operationen so auszuführen, daß keine Adhäsionen zwischen der Milz einerseits und der Bauchwand oder anderer Organe andererseits entstehen, so müssen sämtliche implantierten Stoffe bevor sie an ihren Wirkungsort gelangen, die Leber passieren. Mit dieser Versuchsanordnung läßt sich unter anderem die Frage prüfen, ob die Leber die Sexualhormone inaktiviert, oder eventuell modifiziert, wenn ja ob vollständig, oder ob ein gewisser Schwellenwert besteht, oder ob immer ein gleicher Prozentsatz der angebotenen Stoffe verändert wird. Als Testung kann man die Vaginalabstriche und die Histologie der Genitalien verwenden.

Inaktivierung von weiblichen Sexualhormonen durch die Leber

Wie wir aus einer Reihe von Arbeiten schließen können, scheint die Leber eine wichtige Rolle im Um- und Abbau von östrogenen Stoffen zu spielen.

1934 publizierte *Zondek*¹ seine Versuche, wonach ein Ovar in das Mesenterium kastrierter Ratten implantiert, keinen Östrus hervorzurufen vermag. Ebenfalls fand er, daß Leberschnitte in vitro ovarielle Hormone inaktivieren. Gleiches zeigten *Samuels* und *McCauley*² sowie *Heller*³. Sie wiesen jedoch darauf hin, daß das Tempo von Tierart zu Tierart verschieden sei. Gleiche Resultate wie *Zondek*

hatten auch *Golden* und *Severinghaus* ⁴, wobei sie auch zeigen konnten, daß die Hypophyse bei Tieren mit einem Ovar im Mesenterium die gleiche Potenz wie bei Kastraten hatte. Ebenfalls zu gleichem Resultat kamen *Biskind* und *Biskind* ⁵ bei Ratten mit Milzovar.

Nach Schädigung der Leber mit Tetrachlorkohlenstoff brauchten *Pinkus* und *Martin* ⁶ bedeutend kleinere Dosen von Ovarialhormonen um einen Östrus hervorzurufen.

Mit zirka 1 mg schweren Östradioltabletten in die Milz kastrierter Ratten implantiert konnte *Biskind* ⁷ höchstens einen Östrus von 18 Tagen hervorrufen. Subkutan genügte die Dosis für 70–80 Tage. Leider verwendete *Biskind* als Test nur die Vaginalabstriche. Eine Verifizierung durch die Histologie der Genitalien fehlt.

Nach *Segaloff* und *Nelson* ⁸, sowie nach *Fels* ⁹ werden 98% der östrogenen Stoffe in der Leber oder Milz bei der Ratte inaktiviert.

Zondek ¹⁰ wies nach, daß nicht das Reticulo Endotheliale System sondern die Leberzellen selbst für die Inaktivierung verantwortlich sind.

Die Leber mangelernährter Ratten (Vitamin B frei, *Biskind* und *Shelesnyak* ¹¹, Futter mit Eiweißdefizit, *Unna* et al.¹²) war nicht imstande, Stereoidhormone zu inaktivieren.

Progesteron wird nur begrenzt durch die Leber von Ratten inaktiviert (*Dosne* ¹³).

Lipschütz und *Acuna* ¹⁴ zeigten, daß auch die tumorerzeugende Wirkung der Östrogene durch die Leber verhindert wird, während die Leber auf den gleichen Effekt, durch Stilbene hervorgerufen, keinen Einfluß hat (*Lipschütz* et al.¹⁵).

Progesteron bei Kaninchen (*Fels* und *Monaco* ¹⁶) und östrogene Hormone bei Affen werden durch die Leber nicht inaktiviert (*Hooker* et al.¹⁷, *Wagenen* und *Gardner*.¹⁸).

Glass et al. ¹⁹ konstatierten bei einigen Patienten mit Leberzirrhose eine Gynaecopathie und schlossen, daß die geschädigte Leber die Östrogene nicht mehr inaktiviert.

Aus den meisten dieser Arbeiten kann man schließen, daß in der Leber eine Inaktivierung von Sexualhormonen stattfindet. Jedoch hängt deren Vollständigkeit von verschiedenen Faktoren ab; Tierart, Hormonart und -quantum, Ernährungszustand des Organismus und vor allem der Funktionszustand der Leber.

Versuche mit dem Milzovar

Gestützt auf die Annahme der inaktivierenden Funktion der Leber,

ermöglicht das Milzovar die Wirkung der Hypophyse auf das Ovar zu studieren, wenn diese nicht unter dem Einfluß östrogenen Stoffe steht.

Das Ovar der Ratte wird gleich nach der Implantation in die Milz luteinisiert (*Biskind* und *Biskind* ²⁰). Dieser Luteinisierungsvorgang zieht sich beim Meerschweinchen über Monate hin (*Lipschütz* ²¹). Der Vorgang kann durch Progesteron, Östradiol, Desoxycorticosteron (*Lipschütz* et al. ²²) und Testosteron (*Fischer* und *Wenner* ²³) mannigfach beeinflußt werden.

Fischer ²⁴ fand bei kastrierten Meerschweinchen mit Milzovar stark hypertrophierte Genitalien. Somit stand er vor der Tatsache, daß die Hypophyse das Milzovar ungehemmt anregte, dieses aber Hormone produzierte, die trotz Leberpassage die Genitalien zur Hypertrophie brachten. Daß die Wirkung auf die Genitalien nicht von der unbremsten Hypophyse stammte, zeigten *Wenner* und *Hofmann* ²⁵, *Hofmann* ²⁶, *Hofmann* und *Wenner* ²⁷, *Wenner* ²⁸.

Die quantitativen Verhältnisse der Inaktivierung von östrogenen Stoffen in der Leber

Durch die ebenso interessanten wie überraschenden Ergebnisse von *Fischer* angeregt, versuchten wir, den von ihm aufgeworfenen Fragenkomplex von einer anderen Seite her zu beleuchten.

Fischer konnte konstatieren, daß ein zur Hyperplasie angeregtes Milzovar so viele Hormone produziert, daß mindestens ein Teil davon in irgendeiner wirksamen Form die Leber passiert und die Genitalien zum Wachstum anregen kann.

Daraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Inaktiviert die Leber immer einen konstanten Prozentsatz der ihr angebotenen östrogenen Stoffe? oder
2. Besteht, wie zum Beispiel bei der Niere, ein gewisser Schwellenwert, bis zu welchem die Leber sämtliche Hormone inaktiviert, den Rest jedoch passieren läßt?
3. Wie ist das Verhältnis der Wirkungsstärke intrasplenisch applizierter östrogenen Stoffe zu subkutan verabreichen? Oder anders gefragt:
4. Ist die Leber überhaupt für eine Inaktivierung von östrogenen Stoffen in meßbarer Größe verantwortlich zu machen?

Wie einleitend beschrieben, existieren eine Reihe von Arbeiten, die der Leber eine hormoninaktivierende Funktion zuschreiben. Nur

ganz wenige haben jedoch die quantitative Seite dieser Frage beleuchtet.

Burill und *Greene*²⁹ stellten bei adrenalectomierten Ratten für Desoxycorticosteron einen Leberschwellenwert fest.

Segaloff und *Nelson*⁸ fanden, daß 98% des in die Milz injizierten Follikelhormons durch die Leber zerstört wird.

Dazu möchten wir bemerken, daß man wohl gewisse Größenordnungszahlen mit Hormoninjektionen erhalten kann, daß aber eine solche Injektion einem Hormonstoß gleichzusetzen ist. Auf diese Art ist also ein kontinuierlicher Hormonfluß nicht garantiert. Entgegen dem ist aber anzunehmen, daß das natürliche Ovar und wohl auch das Milzovar seine Stoffe kontinuierlich in den Kreislauf abgibt.

Wir glauben, daß dieser natürliche Vorgang noch am ehesten durch Tablettenimplantation imitiert werden kann. Diese Annahme wird durch eine Reihe von Arbeiten mit Hormontabletten bestätigt (*Emmens*³⁰, *Mark* und *Biskind*³¹, *Lipschütz* und *Vargas*³²).

Die Größe der Resorptionsgeschwindigkeit liegt in den verschiedenen Arbeiten weit auseinander. Wir glauben mit *Wattenwyl*³³ annehmen zu dürfen, daß das Resorptionstempo von Gewicht und Größe der Tablette, deren Oberfläche, Herstellungsart und Härte abhängt und davon, ob das Hormon frei oder verestert ist.

Eigene Versuche

Versuchsanordnung

38 weiße, reife, weibliche Ratten im Gewicht von 125–235 g wurden kastriert. Frühestens 3 Wochen später wurden die Tabletten mit Östrogenen in verschiedenen Konzentrationen und von verschiedenem Gewicht in die Milz implantiert. Zu Beginn alle Tage, später alle 2 Tage wurden laufend Vaginalabstriche gemacht. Nach 2–199 Tagen wurden die Tiere getötet und deren Genitalien mikroskopisch untersucht.

Parallel standen 39 reife, weibliche Meerschweinchen im Gewicht von 295–495 g im Versuch, bei denen analog vorgegangen wurde. Sie wurden nach 2–202 Tagen getötet.

5 Ratten und 6 Meerschweinchen erhielten zur Kontrolle ihre Tabletten subkutan implantiert.

Wir wählten für unsere Versuche 2 Parallelreihen mit verschiedenen Tierarten, um Vergleiche ziehen zu können, da, wie die einleitend

zitierten Autoren feststellen konnten, die Leber verschiedener Tierarten in ungleichem Ausmaß und Tempo die östrogenen Stoffe inaktiviert.

Prinzipiell war die Methode für Ratten und Meerschweinchen die gleiche, so daß wir uns mit der Beschreibung einer begnügen können.

Operationen

Sämtliche Operationen wurden in reiner Äthernarkose durchgeführt. In einem ersten Arbeitsgang wurden alle Tiere kastriert. Frühestens drei Wochen später schlossen wir die zweite Operation an. Vorher vergewisserten wir uns anhand von 2–3 Vaginalabstrichen in zweitägigen Intervallen, daß die Kastration vollständig war.

Wir legten einen Schnitt von 1 cm in longitudinaler Richtung links 1 cm lateral der Wirbelsäule und $\frac{1}{2}$ cm unterhalb des Rippenbogens durch die Rückenwand. Dann hoben wir die Milz vorsichtig heraus. Hierauf nahmen wir die vorher mittels einer Torsionswaage gewogene Tablette zwischen eine spitze, gebogene Pincette, setzten mit deren Spitze einen kleinen Schlitz in die Milz und schoben im gleichen Zug die Tablette in das Organ. Dadurch wurde eine starke Blutung vermieden. Wir umgaben dann die Milz mit Mesosplenium, um nach Möglichkeit Verwachsungen mit der Bauchwand zu vermeiden. Anschließend wurde die Wunde versorgt. Sie heilten alle in sehr kurzer Zeit, mit Ausnahme von drei Tieren, p. p.

Bei 6 Meerschweinchen und 5 Ratten wurde die zweite Operation weggelassen. Dafür erhielten diese Tiere eine Tablette in eine Unterhauttasche am Nacken implantiert. Nach *Wattenwyl*³³ ist dies die günstigste subcutane Applikation.

Abstriche

An den folgenden Tagen wurden täglich, später alle 2 Tage Vaginalabstriche gemacht und mit Karbolfuchsin gefärbt. Von Tieren, die im Dauerversuch standen, verfertigten wir nach zirka vier Wochen nur noch alle 8–14 Tage einen Vaginalabstrich.

Futter

Während der ganzen Versuchszeit erhielten die Ratten vor allem ihr Futter aus den Resten der Spitalküche plus zusätzlichem Trockenfutter, während die Meerschweinchen neben den Resten Salatblätter

und Heu bekamen. Die Tiere gediehen bei dieser uneinheitlichen Kost sehr gut.

Sektion und Behandlung der Tabletten

Nach 2–202 Tagen setzten wir die Tiere unter eine Glasglocke, in die wir hierauf Leuchtgas einströmen ließen.

In der darauffolgenden Sektion wurde die Bauchwand in der vollen Länge aufgeschnitten und aufgeklappt, so daß der ganze Situs sichtbar wurde. Hierauf suchten wir sorgfältig nach Verwachungen zwischen Milz und Bauchwand. Solche fanden sich bei 5 Meerschweinchen und 4 Ratten. Auf diese Tiere werden wir später noch zu sprechen kommen. Nirgends fanden sich Adhäsionen zwischen der Milz und anderen Organen. Dann lösten wir den ganzen Uterus mit beiden Cornua und dem größeren Teil der Vagina im Zusammenhang heraus und legten sie in Susalösung. Die Tabletten wurden aus der Milz entfernt, mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend während 10–14 Tagen im Brutschrank bei 60 Grad Celsius getrocknet und später gewogen.

Histologie

Fixationen und Einbettungen wurden nach Vorschriften von *Romeis* ausgeführt. Gefärbt wurden die Präparate in 2 Arbeitsgängen: zuerst vorbereitend mit Hämalaun und dann mit Jaune solide.

Material

Wir begannen unsere Versuche mit der Arbeitshypothese, daß ein Leberschwellenwert für östrogene Stoffe besteht. Über dessen Größe tappten wir vollständig im Dunkeln. Wir mußten deshalb mit sicher überschwelligen Dosen beginnen und wählten hierzu 10 mg Tabletten von reinem Östradiol CIBA. Im weiteren Verlauf der Versuche mußten wir auf bedeutend kleinere Dosen hinuntergehen. Dies bot insofern Schwierigkeiten, als es nach Angaben der CIBA technisch nicht möglich war, bedeutend kleinere Mengen zu tablettieren. Es bestanden prinzipiell drei Möglichkeiten auf kleinere Dosen zu kommen, die wir alle anwandten:

a) Wir zerkleinerten mechanisch die 10 mg Tabletten soweit, daß wir Bröckel von etwa 1 mg implantieren konnten. Damit hatten wir aber auch eine proportional größere Oberfläche, was nicht erwünscht war, wußten wir doch, daß die Resorption proportional der Oberfläche und nicht dem Gewicht geht ³².

b) Wir verwendeten Tabletten, in denen gleichmäßig Östradiol und Cholesterin vermischt waren. Da wir am Ende des jeweiligen Versuches die Resorptionsmenge aus der Differenz von Anfangs- und Endgewicht ermittelten, war es hier nicht möglich, absolut genaue Zahlen zu erhalten, da das Resorptionsverhältnis aus solchen Mischtabletten nicht exakt bekannt ist. Jedenfalls soll nach *Forbes*³⁴ die Resorption von Cholesterin von kaum meßbarer Größe sein. *Shmin-kin* und *White*³⁵ konnten mit solchen Mischtabletten besonders langsame Resorptionen erzielen.

c) Verschiedene Resorptionsversuche in der CIBA ergaben, daß Östradioldibenzoat bedeutend langsamer resorbiert wird als unverestertes Östradiol. Dies ergab eine weitere Möglichkeit, auf kleinere Dosen zu kommen.

Schließlich konnten diese drei Methoden auch beliebig kombiniert werden, also zum Beispiel Verwendung von Bröckeln von Mischpräparaten.

In der Folge seien die verwendeten Tablettenformen und -dosen zusammengestellt:

Tabletten zu 10 mg: Östradiol, 0,5 mg Östradiol + 9,5 mg Cholesterin, Östradioldibenzoat.

Tabletten zu 5 mg: Östradiol, 1 mg Östradiol + 4 mg Cholesterin, 0,25 mg Östradiol + 4,75 mg Cholesterin.

Tablettenbröckel zu 1 mg: Östradiol, Östradioldibenzoat, 0,1 mg Östradioldibenzoat + 0,9 mg Cholesterin.

*Ergebnisse **

Den Effekt unserer Hormonapplikation haben wir nach folgenden Kriterien beurteilt:

- I. Vaginalabstriche,
- II. Makroskopisches Aussehen von Uterus und Vagina,
- III. Mikroskopisches Bild von Uterus und Vagina.

Wir wollen vorerst die wesentlichen Veränderungen an Vagina und Uterus zusammenstellen, wie wir sie bei verschiedener Hormonmenge und Applikationsdauer in unseren Versuchen registrieren konnten. Ähnliche Veränderungen konnten verschiedene Autoren nach Östrogenapplikation bei der Ratte und dem Meerschweinchen feststellen.

* Die genauen Kriterien zur Ermittlung unserer Resultate sind im Originalmanuskript nachzulesen.

I. Vaginalabstriche

a) *Ratten* (erstmal beschrieben durch *Allen, Doisy et al.*³⁶.)

Keine Östrogenwirkung: Dioestrus: –

Viel Schleim und Leukozyten und vereinzelte Epithelien.

Beginnende Östrogenwirkung: Proöstrus: +, +(+), ++(+)

Zurücktreten von Schleim und Leukozyten, Zunahme von Epithelien mit Degenerationszeichen.

Stärkere Östrogenwirkung: Östrus: +++

Kernlose, verhornte Epithelien: Schollen.

Sistierende Östrogenwirkung: Metöstrus.

Massenhaft kernhaltige Epithelien, viele Leukozyten.

Protrahierte Östrogenwirkung: Daueröstrus: ++++

Wochenlang Schollen, dann Wechsel Metöstrus Östrus.

b) *Meerschweinchen*

Prinzipiell waren die gleichen Veränderungen festzustellen wie bei den Ratten. Die Stadien waren jedoch nicht so scharf zu unterscheiden. Wir konnten auch Abstriche erhalten, die für Diöstrus sprachen, während der histologische Befund an den Genitalien für eine sehr starke Östrogenwirkung sprach. Wir werden auf diesen Befund später noch zurückkommen. Bei den Meerschweinchen war ein weiterer Hinweis auf eine eingetretene Östrogenwirkung auch darin zu finden, daß 2–4 Tage nach der Hormonapplikation der verklebte Scheideneingang sich weit öffnete. Der Introitus war dann feucht und gerötet.

II. Makroskopisches Aussehen

Im großen ganzen waren die gleichen Veränderungen bei beiden Tierarten festzustellen, wobei jedoch diejenigen beim Meerschweinchen ausgeprägter waren. Je nach Stärke der makroskopisch sichtbaren Veränderungen haben wir willkürlich 4 Stadien abgegrenzt.

Keine Östrogenwirkung: 0.

Die Cervix war schmal, die Uterushörner ganz zart und die Vagina hatte dementsprechend ein enges Lumen.

Eingetretene Östrogenwirkung: ×, ××, ×××, ××××.

Die Cervix war verdickt, die Uterushörner plump, stärker gerötet, die Vagina erweitert.

Makroskopisch schwankten die Veränderungen je nach Stärke und Dauer der Hormonwirkung in weiten Grenzen (Abbildung 1 und 2).

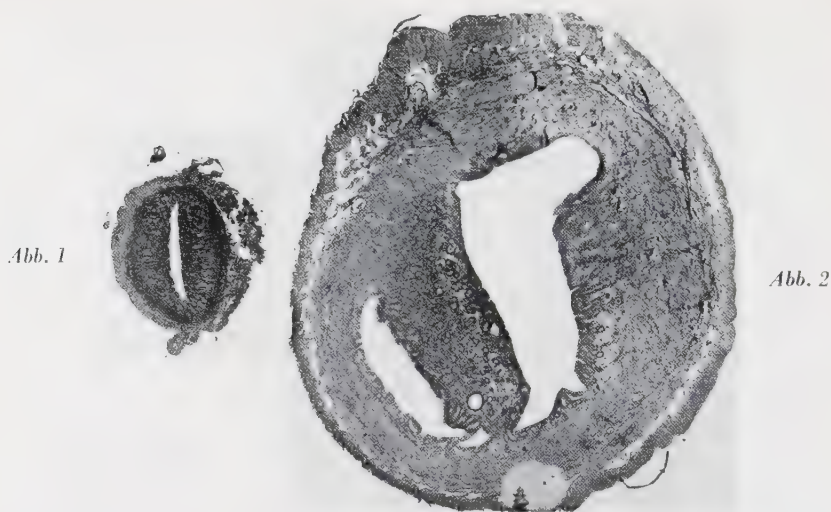


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1: Meerschweinchen: Uterusquerschnitt nach zweimonatiger Implantation von 0,1 mg Oe. dib. + 0,9 mg Ch. in die Milz. Vergr. 16:1.

Abb. 2: Meerschweinchen: Uterusquerschnitt nach viertägiger Implantation von 1 mg Östradiol in die Milz. Vergr. 16:1.

III. Mikroskopisches Bild

In unseren Versuchen erhielten wir gleiche Bilder, wie für die Ratte mit Östrogenapplikation unter anderem von *Selye et al.*³⁷, *Kaufmann* und *Steinkamm*³⁸, *Grumbrecht*^{39, 40}, *Biedermann*⁴¹ und *Fels*⁴² beschrieben wurden, und für das Meerschweinchen durch *Wolfe et al.*⁴³, *Nelson*⁴⁴, *Lipschütz et al.*^{45, 46}, *Wattenwyl*³³.

Vagina

Keine Östrogenwirkung: 0.

Ratten: Faltenarme Mucosa, kubisches ein- bis zweischichtiges, schleimbildendes Epithel.

Meerschweinchen: Ähnliches Bild, Schichten kräftiger ausgebildet.

Geringe Östrogenwirkung: ×.

Ra: Stärkere Durchblutung und aufgelockertes Stroma. Schleimbildendes Zylinderepithel.

Ms: Gleiches Bild.

Mittlere Östrogenwirkung: × ×.

Ra: Übergang in verhornendes Plattenepithel.

Ms: Gleiches Bild.

Starke Östrogenwirkung: $\times \times \times$.

Ra: Merkmale stärker ausgeprägt als oben.

Ms: Bei vielen Tieren war das Plattenepithel durch hochzylindrisches schleimbildendes Epithel ersetzt (Abb. 3), bei andern bestand Plattenepithel.

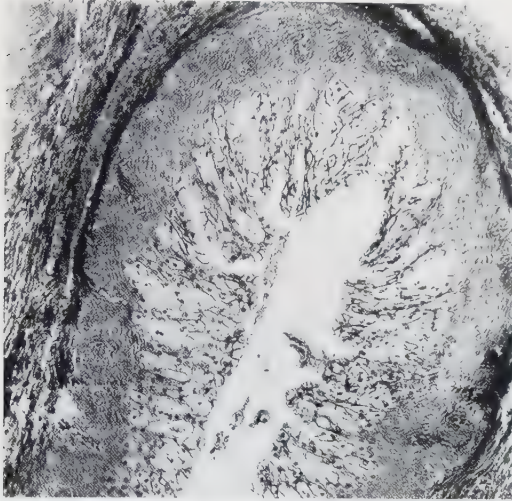


Abb. 3: Meerschweinchen: viertägige Implantation von 1 mg Östradiol in die Milz. Querschnitt durch die Vaginalschleimhaut. Vergr. 90:1.

Bei sehr starker Hormonwirkung trat dieses Schleimepithel gleichzeitig mit der Bildung des Plattenepithels auf. Da es auf letzterem saß, wird es erklärlich, wieso einige Tiere während längerer Zeit keinen östrusähnlichen Vaginalabstrich zeigten. Das Schleimepithel verhinderte ein Abstoßen von Schollen ins Lumen.

Sehr protrahierte Östrogenwirkung: $\times \times \times \times$.

Ra: Bei einigen Tieren: Abnahme der Schichtdicke, viele Leukozyten darin, bei anderen hochgeschichtetes Plattenepithel.

Ms: Hohes Zylinderepithel, weite Vagina.

Cervix

Keine Östrogenwirkung: 0.

Ra: Kubisches Epithel, weites Lumen, plumpe Falten.

Ms: Gleiches Bild.

Geringe Östrogenwirkung: $\times$.

Ra: Hochzylindrisches Epithel. Wenig Schleim in den Drüsen.

Ms: Sternförmiges Lumen. Hochzylindrisches Epithel.

Mittlere Östrogenwirkung: $\times \times$.

Ra: Epithelproliferation, Muskelhypertrophie.

Ms: Gleiches Bild.

Starke Östrogenwirkung: $\times \times \times$.

Ra: Verhornendes Plattenepithel, Hornperlenbildung.

Ms: Gewaltige Epithelproliferation, aufgetriebene Cervix (Abb. 4).

Sehr protrahierte Östrogenwirkung: $\times \times \times \times$.

Ra: Verdicktes Plattenepithel, zum Teil ulzerös, nekrotisch.

Ms: Obige Veränderungen verstärkt.

Meerschweinchen: viertägige Implantation von 1 mg Östradiol in die Milz

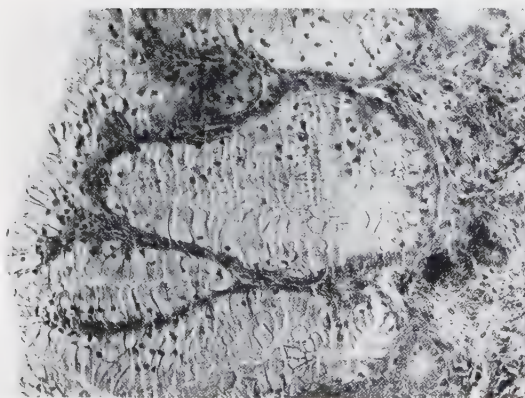


Abb. 4

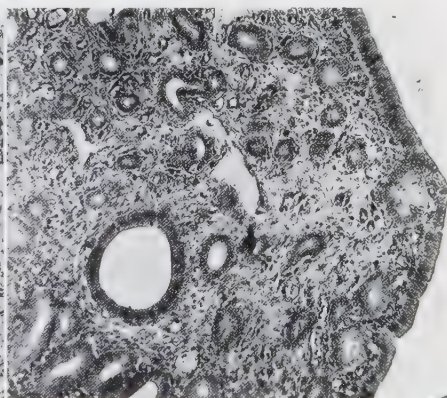


Abb. 5

Abb. 4: Querschnitt durch Cervixschleimhaut. Vergr. 130:1.

Abb. 5: Querschnitt durch Uterushornschleimhaut. Vergr. 90:1.

Uterushorn

Keine Östrogenwirkung: 0.

Ra: Drüsenreiche Mucosa, kubisches Epithel.

Ms: Gleiches Bild.

Geringe Östrogenwirkung: $\times$.

Ra: Hochzylindrisches, schleimbildendes Epithel.

Ms: Gleiches Bild.

Mittlere Östrogenwirkung: $> >$.

Ra: Mehrschichtiges Zylinderepithel, geschlängelte Drüsen.

Ms: Gleiches Bild.

Starke Östrogenwirkung: $\times \times \times$.

Ra: Bei einigen Tieren Epithelmetaplasie, bei andern glanduläre Hyperplasie.

Ms: Glandulär zystische Hyperplasie (Abb. 5).

Sehr protrahierte Östrogenwirkung: $\times \times \times \times$.

Ra: Gehäufte Epithelmetaplasien und glanduläre Hyperplasien.

Ms: Glandulär zystische Hyperplasien, zum Teil Ulzerationen.

Nach dieser Beschreibung der von uns angewandten Kriterien, lassen wir eine tabellarische Zusammenstellung unserer Versuchsergebnisse folgen (Tabelle 1 und 2).

Hierzu ist zu bemerken, daß teilweise beträchtliche individuelle Schwankungen bei den verschiedenen Tieren der einzelnen Gruppen bestanden. Manchmal konnten wir sogar bei ein und demselben Tier verschieden ausgesprochene Veränderungen an den beiden Uterushörnern feststellen. Wie schon Wattenwyl³³ beschrieb, sind solche Variationen oft unabhängig vom resorbierten Hormonquantum. Wir geben deshalb die von uns gefundenen Mittelwerte an (Tab. 1 u. 2).

Aus diesen beiden Tabellen können wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Zwischen Ratten und Meerschweinchen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Wir werden deshalb unsere Ergebnisse für beide Tierarten zusammen besprechen.

2. Wie schon früher erwähnt, entstanden nach der Implantation der Tablette in die Milz bei 5 Meerschweinchen und 4 Ratten zum Teil breite Verwachsungen zwischen Milz und Bauchwand. Im Gewebe dieser Verwachsungen konnten wir eine reichliche Blutversorgung feststellen, so daß anzunehmen war, daß auch Hormone die Möglichkeit hatten, die Leber zu umgehen.

Zu unserer großen Überraschung wiesen die Genitalien dieser Tiere kaum einen Unterschied auf zu den Paralleltieren ohne Adhäsionen.

3. In der Nähe des Schwellenwertes waren wir erst mit Tablettenbröckel bestehend aus 0,1 mg Östradioldibenzoat gemischt mit 0,9 mg Cholesterin. Für diese Tiere haben wir eine tägliche Resorption von zirka 1 Gamma errechnet. Als wir dann jedoch die Kontrolltiere mit subkutaner Implantation der gleichen Hormonmenge untersuchten, konnten wir konstatieren, daß die Genitalien die gleichen geringen

TABELLE I

*Befunde an kastrierten weiblichen Ratten nach intrasplenischer und subkutaner Implantation
verschiedener Östrogen-tabletten*

Tablette in mg	Resorp- tion pro die in γ	Versuchs- dauer Tage	Anzahl Tiere	Implan- tations- ort	Vaginal- abstrich	Makrosk. Vagina Uterus	Mikroskopischer Befund		
							Vagina	Cervix	Uterus- horn
10 Ö	46	7	2	Milz	++	× ×	× ×	× ×	× ×
10 Ö	29,3	62-71	4*	Milz	++	× × × (×)	× × ×	× × ×	× × ×
5 Ö	23,8	30-66	2	Milz	++	× ×	× ×	× ×	× ×
1 Ö	18,9	2-7	6*	Milz	++ (+)	× × (×)	× × ×	× × (×)	× ×
1 Ö + 4 Ch	5,5	38-130	3*	Milz	++	× × × (×)	× × × ×	× × × (×)	× × × (×)
0,25 Ö + 4,75 Ch	3,1	21	2	Milz	++	× × ×	× × ×	× × ×	× × ×
0,25 Ö + 4,75 Ch	2,9	130-199	3	Milz	++	× × × (×)	× × ×	× × ×	× × ×
10 Ö. dib.	4,9	64	1	Milz	++	× × ×	× × ×	× × ×	× × ×
1 Ö. dib.	2,3	2-20	4	Milz	++ (+)	× × (×)	× × (×)	× × ×	× × (×)
1 Ö. dib.	2,2	32-116	3*	Milz	++ (+)	× ×	× × ×	× × (×)	× × (×)
1 Ö. dib.	1,9	8-20	2	s. c.	++	× (×)	× (×)	× ×	× ×
1 Ö. dib.	1,8	116	1	s. c.	++	× ×	× ×	× ×	× (×)
0,1 Ö. dib. + 0,9 Ch	1,1	71	3	Milz	(+)	×	× ×	× ×	× ×
0,1 Ö. dib. + 0,9 Ch	1,2	71	2	s. c.	++ (+)	× (×)	× (×)	× ×	× ×
Kontrolle	0	0	1	-	-	0	0	0	0

* Darunter 1 Tier mit Adhäsionen
 Ö. = Östradiol
 Ö. dib. = Östradioldibenzooat
 Ch. = Cholesterin
 s. c. = subkutan

-	Diöstrus	Keine Östrogenwirkung
(+), + (+)	Proöstrus	Geringe Östrogenwirkung
++ (+)		Mittlere Östrogenwirkung
+++	Östrus	Starke Östrogenwirkung
++++	Daueröstrus	Schr protrahierte Östrogenwirkung

TABELLE 2

*Befunde an kastrierten weiblichen Meerschweinchen nach intrasplenischer und subkutaner
Implantation verschiedener Östrogentabletten*

Tablette in mg	Resorp- tion pro die in γ	Versuchs- dauer Tage	Anzahl Tiere	Implan- tations- ort	Vaginal- abstrich	Makrosk. Vagina Uterus	Mikroskopischer Befund Vagina Cervix Uterus- horn
10 Ö.	44,4	6-9	4*	Milz	-	× × ×	× × ×
10 Ö.	27,5	24-70	3*	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
10 Ö.	26,1	42	1	s. c.	+ (+)	× × × ×	× × × ×
5 Ö.	22,5	35	2	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
1 Ö.	17,6	2-6	6*	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
1 Ö. + 4 Ch.	5,2	140-202	2	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
0,5 Ö. + 9,5 Ch.	4,2	30-187	3*	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
0,25 Ö. + 4,75 Ch.	2,3	12-18	2	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
0,25 Ö. + 4,75 Ch.	2,1	30-203	4*	Milz	(+)	× × × ×	× × × ×
10 Ö. dib.	4,6	66	1	Milz	+ + + +	× × × ×	× × × ×
1 Ö. dib.	2,2	2-6	3	Milz	+ (+)	× × × ×	× × × ×
1 Ö. dib.	2,0	39-102	3	Milz	+ (+)	× × × ×	× × × ×
0,1 Ö. dib. + 0,9 Ch.	1,2	75	3	Milz	+ (+)	× × × ×	× × × ×
0,1 Ö. dib. + 0,9 Ch.	1,0	75	2	s. c.	+ (+)	× × × ×	× × × ×
Kontrolle	0	0	1	-	+ (+)	× × × ×	× × × ×

* Darunter 1 Tier mit Adhäsionen

Ö. = Östradiol

Ö. dib. = Östradioldibenzozat

Ch. = Cholesterin

s. c. = subkutan

Diöstrus

(+) , + (+)

+ (+)

+ + +

+ + + +

Proöstrus

Östrus

Daueröstrus

0

×

× ×

× × ×

× × × ×

Keine Östrogenwirkung

Geringe Östrogenwirkung

Mittlere Östrogenwirkung

Starke Östrogenwirkung

Sehr protrahierte Östrogenwirkung

Veränderungen aufwiesen (Abb. 6, 7, 8, 9). Wir hatten also auch hier praktisch den Schwellenwert erreicht. Dies bedeutet aber für diese Tiere, daß wir bei derjenigen Hormonmenge angelangt waren, die gerade noch nach längerer Applikation die Genitalien mikroskopisch feststellbar veränderte. Diese Menge war in unseren Versuchen für beide Tierarten annähernd gleich groß, und zwar bei zirka 1 Gamma pro die von Östradioldibenzoat. Diese Schwellenwertsdosis dürfte in Wirklichkeit etwas kleiner sein, da bei unserer Methodik mögliche Fehlerquellen zu große Zahlen verursachten.

Abb. 6

Abb. 7

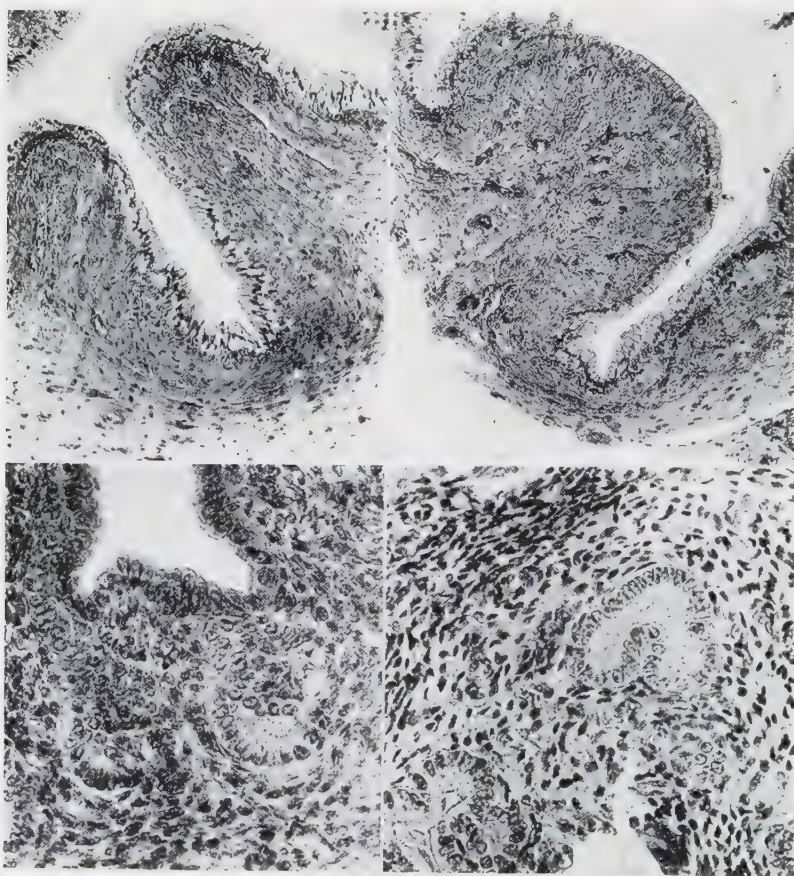


Abb. 8

Abb. 9

Abb. 6: Meerschweinchen: Querschnitt durch Cervixschleimhaut nach zweimonatiger Implantation von 0,1 mg Oe. dib. + 0,9 mg Ch. in die Milz. Vergr. 130:1.

4. Die mikro- und makroskopischen Befunde einerseits und die Vaginalabstriche andererseits stimmten nicht immer ganz überein, dies vor allem bei den Meerschweinchen.

Eine Kontrolle einer Östrogenwirkung allein nach den Vaginalabstrichen zu beurteilen, ist deshalb nach unseren Erfahrungen unzulässig.

5. Kleine Follikelhormondosen über längere Zeit verabfolgt riefen sehr starke Veränderungen an den Genitalien hervor. Diese konnten mit wesentlich größeren Dosen nicht mehr signifikant gesteigert werden.

Wurden aber diese kleinen Dosen (3–4 Gamma pro die) um nur wenig gesenkt, zum Beispiel auf 1 Gamma pro die, so befanden wir uns bei derjenigen Hormonmenge, die gerade noch mikroskopisch feststellbare Veränderungen hervorrief. Diesen Befund konnten wir sowohl bei intrasplenischer als auch bei subkutaner Applikation erheben.

6. Die Resorptionsverhältnisse.

a) Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß mit zunehmender Versuchsdauer die tägliche Resorptionsmenge abnahm. Gleiches konnten *Walter et al.*⁴⁷ zeigen, die in ihren Versuchen konstatierten, daß nach 180 Tagen überhaupt nichts mehr resorbiert wurde. Auch *Wattenwyl*³³ stellte in seinen Versuchen eine abnehmende tägliche Resorption fest. Um die Tablette entstand nach genügend langer Versuchsdauer eine ziemlich straffe Bindegewebshülle. Dies kann uns vielleicht diese Resorptionsverlangsamung erklären. Natürlich ist auch zu sagen, daß durch die verschiedenen Manipulationen mit der Tablette Fehlerquellen entstehen können, die sich auf kurze Zeit berechnet bedeutend stärker auswirken als bei langer Versuchsdauer. (Wir berechneten die tägliche Resorption durch einfache Division der Gewichts-differenz der Tabletten durch die Anzahl Versuchstage.)

b) Östradioldibenzoat wurde zirka sechsmal langsamer resorbiert als das unveresterte Hormon. Dies stimmt mit den Angaben von *Deanesly und Parkes*⁴⁸, *Warwick und Parkes*⁴⁹ und *Emmens*²⁴ über-

Abb. 7: Meerschweinchen: Querschnitt durch Cervixschleimhaut nach zweimonatiger Implantation von 0,1 mg Oe. dib. + 0,9 mg Ch. subcutan. Vergr. 130:1.

Abb. 8: Meerschweinchen: Querschnitt durch Uterushornschleimhaut nach vier-tägiger Implantation von 1 mg Östradiol in die Milz. Vergr. 350:1.

Abb. 9: Meerschweinchen: Querschnitt durch Uterushornschleimhaut nach zwei-monatiger Implantation von 0,1 mg Oe. dib. + 0,9 mg Ch. subcutan. Vergr. 350:1.

ein, wonach das freie Östradiol rascher resorbiert wird als dessen Ester.

c) *Übereinstimmend mit Mark und Biskind*³¹ konnten wir konstatieren, daß der Implantationsort keinen Einfluß auf die Resorptionsgeschwindigkeit hat. So hatten wir für die in die Milz und subkutan verabreichten Tabletten annähernd die gleichen Werte.

d) Bei unseren Mischtabletten konnten wir Resorptionszahlen feststellen, die weit unter denjenigen gleich großer Tabletten reinen Hormons lagen. Die Annahme scheint uns berechtigt, daß das Cholesterin nur einen verschwindend kleinen Prozentsatz der resorbierten Menge ausmachte. Gleichlautende Angaben stammen von Forbes³⁴ und Shminkin und White³⁵.

e) Die Resorption bei unseren Tablettenbröckeln erfolgte relativ ihrem Gewicht rascher als bei den ganzen Tabletten. Dies stimmt mit der von Lipschütz und Vargas³² gemachten Feststellung überein, daß die Resorption unter anderem proportional der Tablettenoberfläche geht.

Diskussion

Die von uns gestellte Aufgabe, die Höhe des Leberschwellenwertes für östrogene Stoffe zu bestimmen, konnten wir nicht lösen. Wir standen am Ende unserer Versuche vor der überraschenden Feststellung, daß intrasplenisch applizierte Follikelhormontabletten die gleiche Wirkung auf die Genitalien ausüben, wie solche, subkutan verabreicht. Wie können wir uns dieses Ergebnis erklären?

Verwachsungen zwischen Milz und Bauchwand waren außer den oben angeführten Beispielen mit Sicherheit auszuschließen. Auch kontrollierten wir stets, ob Adhäsionen zwischen Uterushorn und Milz bestanden. Solche waren in keinem einzigen Fall nachzuweisen. Die Milz lag jeweils frei in situ. Die Vasa lienales waren die einzigen mit ihr in Verbindung stehenden Blutgefäße, somit mußten die resorbierten Hormone mit Sicherheit die Leber passieren. Wie nun die sich daraus ergebende Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und einer Reihe einleitend erwähnten Arbeiten zu erklären ist, wissen wir nicht.

Es scheint uns aber interessant, in diesem Zusammenhang nochmals auf die Versuche von Fischer²⁴ zurückzukommen. Das Milzovar bei seinen Meerschweinchen war in der Lage, die Genitalien auf gleiche Art zum Wachstum anzuregen, wie wir mit kleinen, jedoch noch stark

wirksamen Östrogendosen. Auch bei ihm mußten die vom Ovar gebildeten Stoffe die Leber passieren, und doch waren sie noch für die Genitalien wirksam. Die Hypophyse war jedoch enthemmt. Er vermutete deshalb, daß die östrogenen Stoffe in der Leber nicht inaktiviert, sondern nur modifiziert werden. Wie dem auch sei, sprechen unsere Versuche insofern in einem solchen Sinne, als die östrogenen Stoffe in irgendeiner genitalwirksamen Form die Leber, auch in sehr kleinen Mengen angeboten, verlassen können.

Wir kämen also zum gleichen Ergebnis für Ratten und Meerschweinchen, wie *Hooker et al.*¹⁷ und *Wagenen* und *Gardner*¹⁸ für Affen. Auch sie konnten, jedoch bei Primaten, keine inaktivierende Funktion der Leber für das Follikelhormon feststellen.

Eine etwas ausgefallene Erklärung für unsere Versuche könnte man noch darin finden, daß das an unsere Tiere verabfolgte Futter nicht vollwertig war, so daß die daraus entstehende Hypovitaminose der Leber keine volle Funktionsfähigkeit mehr gestattete. Immerhin hatten wir überhaupt keine Anhaltspunkte, die in diesem Sinne sprachen. Die Tiere waren munter und die meisten von ihnen nahmen während der Versuchsperiode an Gewicht zu.

Als interessante Ergänzung möchten wir in diesem Zusammenhang die Arbeit von *Tschopp*⁵⁰ erwähnen. Er kam zum Ergebnis, daß vor allem der Darm für die Östrogeninaktivierung verantwortlich zu machen sei. Er konnte einen eigentümlich hohen Wirkstoffgehalt im Darm und in der Galle nachweisen. Er schloß daraus, daß die östrogenen Stoffe in den intermediären Leber-Galle-Darmkreislauf eingeschaltet sind. Er konnte durch Unterbindung des Gallenganges eine verlängerte und verstärkte Östrogenwirkung hervorrufen. Hierzu ist allerdings zu sagen, daß die Möglichkeit einer Leberschädigung durch die gestaute Galle nicht auszuschließen ist, was wiederum im Sinne der einleitend erwähnten Arbeiten sprechen würde, d. h. die geschädigte Leber wäre nicht in der Lage die östrogenen Stoffe zu inaktivieren.

1933 machten *Doisy et al.*⁵¹ auf ein den natürlichen Östrogenen verwandtes Hormon aufmerksam, das subkutan verabreicht mindestens gleich wirksam wie die natürlichen Follikelhormone war. Später stellte *Miescher* diesen Stoff rein dar und nannte ihn Doisyinsäure. Sein wesentlicher chemisch konstitutioneller Unterschied liegt in der Sprengung des Fünferinges. 1944 konstatierte dann *Tschopp*⁵² mit einer veresterten Doisyinsäure, daß diese Substanz auf die Genitalien die gleiche Wirkung ausübt, ob sie subkutan oder intrasplenisch

appliziert wird. Sie passiert also die Leber ohne Wirkungseinbuße. Später stellte *Segaloff*⁵³ fest, daß dieses modifizierte Follikelhormon, intrasplenisch verabreicht, sogar wirksamer ist, als bei subkutaner Applikation.

Es wäre nun absolut denkbar, daß die natürlichen Östrogene in der Leber eine ähnliche Modifikation erfahren, wie die hier erwähnten, künstlich vorgenommenen. Diese von der Leber so veränderten Hormone, wie zum Beispiel Aufspaltung des Fünfferrings, würden dann auf die Genitalien ihre ursprüngliche Wirksamkeit beibehalten.

Zu unseren Versuchen möchten wir noch folgendes bemerken:

Es war notwendig, unsere Versuchstiere in viele Gruppen einzuteilen. Die einzelnen Gruppen bestanden deshalb nur aus wenigen Tieren. Diese Verzettlung erst gestattete uns, den sehr großen Bereich eines möglichen Leberschwellenwertes immer mehr einzuengen.

Es besteht nun die Möglichkeit, in weiteren Experimenten auf dieser Basis einer größeren Tierreihe solche Hormondosen zu applizieren, die im Bereiche unserer Grenzwerte liegen. Bei solchen Versuchen würde dann die individuelle Streuung weniger ins Gewicht fallen, und sie wären daher eher angetan, einen genauen Grenzwert anzugeben.

Wenn solche Arbeiten eine Bestätigung unserer Ergebnisse erbringen, so glauben wir, daß viele Theorien und Meinungen über den Wirkungsmechanismus des Follikelhormons und dessen Relation zur Hypophyse revidiert werden müssen, basieren sie doch auf der Annahme, daß die Leber in entscheidendem Ausmaße die östrogenen Stoffe inaktiviert.

Die von uns einleitend aufgeworfenen Fragen können wir nach unseren Versuchen folgendermaßen beantworten:

1. Es war uns nicht möglich, festzustellen, daß die Leber einen konstanten Prozentsatz der ihr angebotenen östrogenen Stoffe inaktiviert.
2. Die von uns verwendeten Follikelhormonmengen waren für die Leber alle überschwellig. Wir konnten somit für östrogene Stoffe bei der Ratte und dem Meerschweinchen keinen Leberschwellenwert ermitteln.
3. Mit gleichen Östrogendosen konnten wir auf Uterus und Vagina keine unterschiedlichen Veränderungen hervorrufen bei subkutaner oder intrasplenischer Applikation.
4. Eine Inaktivierung östrogenen Stoffe durch die Leber in meßbarer Größe war hiermit in unseren Versuchen nicht nachweisbar.

Zusammenfassung

Bei kastrierten Ratten und Meerschweinchen wurde versucht, einen Leberschwellenwert für östrogene Stoffe zu ermitteln, indem Tabletten mit abnehmender Menge von Östradiol und Östradioldibenzoat in die Milz der Tiere implantiert wurden. Zur Feststellung der Hormonwirkung dienten Vaginalabstriche und Untersuchungen von Vagina und Uterus. Langdauernde Applikation von 3–4 Gamma pro die bedeutete eine starke Hormonwirkung, gleichgültig ob intrasplenisch oder subkutan verabreicht. Ein Gamma Östradioldibenzoat pro die hatte subkutan und intrasplenisch nur geringe Wirkung zur Folge. Daraus wurde geschlossen, daß die östrogenen Stoffe in der Leber nicht inaktiviert, sondern höchstens soweit modifiziert werden, daß sie noch genitalwirksam sind.

Summary

Attempt has been made to establish the liver threshold value of oestrogene substances in castrated rats and guinea-pigs after implantation of tablets with decreasing amounts of oestradiol and oestradioldibenzoat into the spleen of the animals. Vaginal smears and examinations of vagina and uterus were used to establish the hormonal effect. Longstanding application of 3 to 4 gamma per day caused intense hormonal effect whether administered intrasplenically or subcutaneously. One gamma oestradioldibenzoat per day subcutaneous and intrasplenic caused only little effect. It is concluded from the above that oestrogene substances are not inactive in the liver, but at best modified as far as to remain effective upon the genital tract.

Résumé

Essai de détermination, chez des rates et des cobayes castrées, d'un seuil hépatique aux œstrogènes. Des comprimés dont la teneur en œstradiol et benzoate d'œstradiol était progressivement diminuée, furent implantés dans la rate des animaux. L'activité hormonale fût contrôlée par les frottis vaginaux et l'examen du vagin et de l'utérus. Les applications de 3 à 4 γ par jour, pendant une longue durée, déterminèrent une activité hormonale intense qu'elles fussent administrées par voie sous-cutanée ou intra-splénique. L'action de 1 γ de benzoate d'œstradiol ne fut que minime quelque fut le mode

d'administration. L'auteur en conclut que les œstrogènes ne sont pas inactivés par le foie, mais qu'ils y sont tout au plus modifiés de telle manière à présenter cependant encore une activité génitale.

Literaturverzeichnis

- ¹ Zondek: Skand. Arch. f. Physiol. 70, 33, 1934. — ² Samuels and McCauley: Univ. of Utah, Salt Lake City. — ³ Heller, C. G.: Endocr. 26, 519, 1940. — ⁴ Golden and Severinghaus: Proc. soc. exp. biol. and med. 39, 361, 1938. — ⁵ Biskind and Biskind: Proc. soc. exp. biol. and med. 55, 43, 1944. — ⁶ Pincus and Martin: Endocr. 27, 838, 1940. — ⁷ Biskind, G. R.: Endocr. 28, 894, 1941. — ⁸ Segaloff and Nelson: Proc. soc. exp. biol. and med. 48, 33, 1941. — ⁹ Fels, E.: Medicina (Buenos Aires, 1942). — ¹⁰ Zondek and Sklow: Proc. soc. exp. biol. and med. 46, 276, 1941. — ¹¹ Biskind and Shelesnyak: Endocr. 30, 819, 1942. — ¹² Unna, Singher, Kensler, Taylor jun., Rhoads: Proc. soc. exp. biol. and med. 55, 254, 1944. — ¹³ Dosne, Ch.: Cancer research 4, 512, 1944. — ¹⁴ Lipschütz et Acuna: Rev. canad. de biologie 3, 96, 1944. — ¹⁵ Lipschütz e. al.: Proc. soc. exp. biol. and med. 55, 43, 1944. — ¹⁶ Fels and Monaco: Rev. Soc. argent. de Biol. 17, 385, 1941. — ¹⁷ Hooker, Drill, Pfeiffer: Proc. soc. exp. biol. and med. 65, 192, 1947. — ¹⁸ van Wagenen and Gardner: Endocr. 46, 265, 1950. — ¹⁹ Glass, Edmondson, Soll: Endocr. 27, 749, 1940. — ²⁰ Biskind and Biskind: Proc. soc. exp. biol. and med. 55, 176, 1944. — ²¹ Lipschütz, A.: Nature, London 157, 551, 1946. — ²² Lipschütz, Iglesias, Bruzzone, Humeres, Pennaranda: Endocr. 42, 201, 1948. — ²³ Fischer und Wenner: Gynaecologia 129, 326, 1950. — ²⁴ Fischer, M.: Gynaecologia 132, 340, 1951. — ²⁵ Wenner und Hofmann: Gynaecologia 130, 382, 1950. — ²⁶ Hofmann, K.: Kontrolle der «Lipschütz»-Versuche, Diss., Basel 1951. — ²⁷ Hofmann und Wenner: Gynaecologia 131, 400, 1951. — ²⁸ Wenner, R.: Conférences du Congrès International jubilaire de la Société Française de Gynécologie 1951. — ²⁹ Burril and Greene: Endocr. 30, 142, 1942. — ³⁰ Emmens, C. W.: Endocr. 28, 633, 1941. — ³¹ Mark and Biskind: Endocr. 28, 465, 1941. — ³² Lipschütz und Vargas: Proc. soc. exp. biol. and med. 48, 464, 1941. — ³³ Wattenwyl, v. H.: Follikelhormon und Tumorwachstum, Basel, Benno Schwabe 1944. — ³⁴ Forbes: Endocr. 30, 761, 1942. — ³⁵ Shminkin and White: Endocr. 29, 1020, 1941. — ³⁶ Allen, Doisy e. al.: Amer. J. Physiol. 68, 138, 1924. — ³⁷ Selye, Thomson, Collip: Nature 135, 65, 1935. — ³⁸ Kaufmann und Steinkamm: Arch. Gynäk. 162, 553, 1936. — ³⁹ Grumbrecht: Arch. Gynäk. 160, 525, 1936. — ⁴⁰ Grumbrecht: Arch. Gynäk. 170, 1, 1940. — ⁴¹ Biedermann: Arch. Gynäk. 167, 465, 1938. — ⁴² Fels: Arch. Gynäk. 158, 364, 1934. — ⁴³ Wolfe, Cambell, Burch: Proc. soc. exp. biol. and med. 29, 1236, 1932. — ⁴⁴ Nelson: Endocr. 24, 50, 1939. — ⁴⁵ Lipschütz, Vargas, Jedlicky, Bellolio: Amer. J. Canc. 39, 185, 1940. — ⁴⁶ Lipschütz und Vargas: Endocr. 29, 622, 1941. — ⁴⁷ Walter, Geist, Salmon: Proc. soc. exp. biol. and med. 44, 214, 1940. — ⁴⁸ Deansley and Parkes: Lancet 235, 605, 1938. — ⁴⁹ Warwick and Parkes: Lancet 238, 406, 1940. — ⁵⁰ Tschopp, E.: Helv. Physiol. Acta 5, 406, 1947. — ⁵¹ McCorquodale, Thayer, Doisy: J. biol. Chem. (Am.) 101, 753, 1933. — ⁵² Tschopp, E.: Sch. med. Wschr. 74, 11, 1944. — ⁵³ Segaloff, A.: Endocr. 42, 15, 1948.